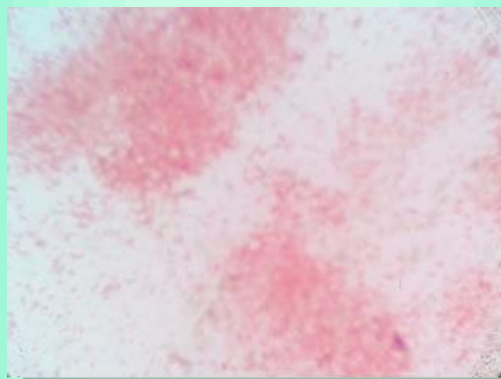


**ESTUDIO DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN
ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL:
SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA. GENOTIPADO Y
DETECCIÓN DE CEPAS DE LINFOGRANULOMA
VENÉREO.**



RÉKA MAULIDE CANE

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**ESTUDIO DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN
ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL:
SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA. GENOTIPADO Y
DETECCIÓN DE CEPAS DE LINFOGRANULOMA
VENÉREO.**

RÉKA MAULIDE CANE

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Madrid, Septiembre 2014

PUBLISHED VERSION AVAILABLE AT: Malaysian Journal of Microbiology

<http://mjm.usm.my/index.php?r=cms/entry/view&id=51>

LINK TO PUBLISHED VERSION:

<http://mjm.usm.my/uploads/issues/644/3.%20Vol12No2-MJM750-15.pdf>

[Pathogens associated with sexually transmitted infections: distribution patterns of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. hominis* and *U. urealyticum*, antimicrobial resistance and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates]

Cane, R. M., rnandez-Mora, M. G., Roblas, R.

ISSN (print): 1823-8262, ISSN (online): 2231-7538

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ESTUDIO DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN
ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN SEXUAL:
SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA. GENOTIPADO Y
DETECCIÓN DE CEPAS DE LINFOGRANULOMA
VENÉREO.**

Memoria presentada por:

RÉKA MAULIDE CANE

Para optar el grado de:

**MÁSTER EN MEDICINA TROPICAL Y SALUD
INTERNACIONAL**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dr. Miguel Górgolas Hernández-Mora
Dr. Ricardo Fernández Roblas**

DR. MIGUEL GÓRGOLAS HERNÁNDEZ-MORA, PROFESOR TITULAR DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y DR. RICARDO FERNÁNDEZ ROBLAS, MÉDICO JEFE ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ.

INFORMAN,

Que la presente Memoria titulada **“Estudio de patógenos implicados en enfermedades de transmisión sexual: sensibilidad antibiótica. Genotipado y detección de cepas de Linfogramuloma venéreo”** que presenta **Réka Maulide Cane**, Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología Médica de la Fundación Jiménez Díaz – IDC Salud.

Y para que conste firmamos el presente informe a 28 de Agosto de 2014.

Fdo.:Dr. Miguel Górgolas Hernández-Mora

Fdo.:Dr. Ricardo Fernández Roblas

Agradecimientos

Este trabajo Fin de Máster ha sido desarrollado en el Departamento de Microbiología Médica de la Fundación Jiménez Díaz - IDC Salud. *Quiero expresar mi agradecimiento al jefe del Departamento, Dr. Ignacio Gadea y al Director Médico de la FJD, Carlos Cenjor Español por darme la oportunidad de realizar este trabajo en el centro y por poner a la disposición los medios técnicos y académicos necesarios para el desarrollo de mi labor investigadora.*

A Dr. Ricardo Fernandez Roblas y Dr. Miguel Górgolas, mis tutores por su apoyo incondicional, sus aportes y críticas y por inculcarme el amor por el estudio de las enfermedades tropicales y de la microbiología. No olvidaré vuestros consejos y enseñanzas durante la realización del máster y del trabajo fin de máster. Os valoro mucho por vuestro amor a la Medicina.

A Dr. Jaime Estebán, Dra. Conchita, Dr. Ramón (Montxo), Dr. Alfonso Cabello, D. Ignacio Mahillo, D. Juan Carlos, D. Pilar, D. Daniel y Dña. Alexandra por su apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todas mis amigas residentes del Departamento de Microbiología, Laura, Chela, Marta pequeña, Mary, María, Marta, por la atención y amistad y por los momentos superguays en la café y en la salita de resis.

A mis compañeros del Título de Experta y del Máster de Medicina Tropical por el compañerismo y por los momentos inolvidables en la UAM y en la FJD.

A mis amigos, en particular Fátima López, por recomendarme el Máster de Medicina Tropical y Salud Internacional.

A mi madre Dalila, la mejor madre del mundo, por inculcarme el amor al prójimo y al estudio y por apoyarme durante la realización del trabajo fin de máster. Me ha enseñado a enfrentar las adversidades con humildad y a nunca desistir de mis sueños.   Khanimambo mama!

A mi hermano Shafik por su apoyo y consejos durante la realización del máster y del trabajo fin de máster.

A mi padre Al-Nassir, que pese su ausencia es sin duda una fuente de inspiración en mi labor en el área sanitaria. Gracias p  p   por enseñarme a luchar mis ideales y a nunca rendirme frente a los obstáculos.   Khanimambo, p  p  !

Gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas

Resumen/ Abstract

1. Introducción.....	1
2. Objetivos y Plan de trabajo.....	5
3. Materiales y métodos.....	6
3.1. Población, muestra y estudio de susceptibilidad.....	6
3.2. Análisis estadístico.....	7
4. Resultados.....	8
5. Discusión.....	15
6. Bibliografía.....	21

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

EUCAST: Comité Europeo de Evaluación de la Susceptibilidad Antimicrobiana.

LGV: Linfogranuloma venéreo.

MALDI-TOF MS: “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry”.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

UN: Uretritis gonocócica.

UNG: Uretritis no gonocócica.

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Objetivo: El objetivo principal del presente trabajo es el estudio del porcentaje de casos de infección por *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Mycoplasma hominis* (*Mycoplasma hominis*) y *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) y la determinación de la resistencia antibiótica a *N. gonorrhoeae* en muestras de pacientes que acudieron a consultas de la Fundación Jiménez Díaz durante el período de 2000 a 2013. Otros objetivos fueron el estudio del porcentaje de casos de linfogranuloma venéreo y la caracterización molecular de cepas de *N. gonorrhoeae*.

Método. Un total de 4.140 muestras de exudados uretrales, endocervicales y/o ano-rectales fueron analizadas mediante PCR en tiempo real para la detección de infección por *C. trachomatis* y 9.232 muestras fueron analizadas mediante cultivos para la detección *N. gonorrhoeae*, *M. hominis* y *U. urealyticum*. El estudio de sensibilidad se hizo mediante antibiograma y E-test y la caracterización molecular se realizó mediante NG-MAST. Las asociaciones fueron examinadas mediante la prueba Chi-cuadrado y/o prueba exacta de Fisher. Se calcularon las ODDs ratio y los intervalos de confianza al 95%. El nivel de significación estadística se estableció cuando p fue inferior a 0,05.

Resultados. El porcentaje de casos de infección por *C. trachomatis* fue de 2% en 2009, 10% en 2010, 18,9% en 2011, 28,4% en 2012 y 39,4% en 2013; siendo más elevado en el grupo de personas entre 25-45 años de edad. Se detectaron 6 casos de LGV 2/2ª en muestras de varones homosexuales españoles/latinoamericanos. Del total de 9,232 muestras analizadas, se aislaron 506 cepas de *N. gonorrhoeae* y 504 cepas de *M. hominis* y *U. urealyticum*. El porcentaje de resistencia antibiótica a los aislados de *N. gonorrhoeae* fue de: 0,6% ceftriaxona, 69% penicilina, 51,8% tetraciclina, 44,3% ciprofloxacino. Los porcentajes de resistencia hallados en 19 cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas en el Centro Nacional de Microbiología fueron: 5,3% cefixima, 47,4% penicilina, 68,4% tetraciclina, 57,9% ciprofloxacino; no hubo resistencias a ceftriaxona, aminoglucósidos y macrólidos. El ST más prevalente fue el ST21 (15,8%). Los ST8433, 4995, 9971, 9973, 9974, 9808, 10026 y 2018 fueron de nueva descripción. El riesgo de infección por *U. urealyticum* fue casi un 20% más bajo en mujeres que en hombres (OR=0,28; IC95%, 0,17-0,44). El riesgo de infección por *M. hominis* fue casi cuatro veces mayor en las mujeres que en los hombres (OR=4,2%; IC95%, 2,13-8,12). Respecto a las infecciones mixtas por *U. urealyticum* y *M. hominis*, las mujeres presentan un riesgo de sufrir infección mixta casi dos veces superior a los hombres (OR=2,26; IC95%, 1,21-4,22).

Conclusiones: Destacamos la aparición de los primeros casos de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación en la Comunidad de Madrid. El NG-MAST nos permitirá un mejor manejo terapéutico de pacientes con cepas multirresistentes. La PCR es una técnica de grande utilidad dentro del laboratorio de Microbiología para la detección de *C. trachomatis* y de linfogranuloma venéreo. El sexo se asocia con el riesgo de infección por *M. hominis* y/o *U. urealyticum*.

ABSTRACT

Objective: To investigate the percentage of cases of *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*), *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*), *Mycoplasma hominis* (*Mycoplasma hominis*) y *Ureaplasma urealyticum* (*U. urealyticum*) infection and to determine the antibiotic resistance pattern in *N. gonorrhoeae* samples of patients attending Jiménez Díaz Foundation Hospital during the period 2000-2013. Additional goals were to study the percentage of cases of lymphogranuloma venereum and molecular characterization of *N. gonorrhoeae*.

Methods: A total of 4,140 samples of urethral, endocervical and anorectal swabs were collected and analyzed by real-time PCR for detection of *C. trachomatis* and a total of 9,232 samples of *N. gonorrhoeae*, *M. hominis* and *U. urealyticum* were collected and analyzed using cultures. Susceptibility testing was carried out using antibiogram and Etest and molecular characterization was performed by NG-MAST. Associations were calculated using the standard chi-square test or, when appropriate, Fisher's exact test. ODDS ratio (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated. P values less than 0,05 were considered significant.

Results: The percentage of cases of *C. trachomatis* infection was 2% in 2009, 10% in 2010, 18,9% in 2011, 28,4% in 2012 and 39,4% in 2013, being higher in people among 25 and 45 years old. L2/L2a *C. trachomatis* genotype was identified in 6/213 (2,8%) urethral and anorectal swabs. All LGV cases were from Spanish and Latin-American men who have sex with men (MSM). A total of 506 strains of *N. gonorrhoeae* and 504 strains of *M. hominis* and *U. urealyticum* were isolated from 9,232 samples of urethral, endocervical and anorectal swabs. The highest resistance level of *N. gonorrhoeae* isolated strains was observed for penicillin G (69%), followed by tetracycline (51,8%) and ciprofloxacin (44,3%). Decreased susceptibility to ceftriaxone was observed in 0,6% of the isolates. The resistance pattern of 19 isolates of *N. gonorrhoeae* analyzed at National Microbiology Centre (CNM) was: 68,4% tetracycline, 57,9% ciprofloxacin, 47,4% penicillin G and 5,3% cefixime; all isolates were susceptible to ceftriaxone, aminoglycosides and macrolides. ST 21(15,8%) was the most prevalent. We identified the following new STs: ST8433, 4995, 9971, 9973, 9974, 9808, 10026 and 2018. The risk of infection by *U. urealyticum* was almost 20% lower in women than in men (OR = 0.28, 95% CI 0.17-0.44). The risk of infection by *M. hominis* was almost four times higher in women than in men (OR = 4.2%, 95% CI 2.13 to 8.12). Concerning mixed infections by *U. urealyticum* and *M. hominis*, women have a risk almost two times higher than men of suffering mixed infection (OR = 2.26, 95%, 1.21-4, 22).

Conclusions: We report the first cases of *N. gonorrhoeae* strains with decreased susceptibility to 3rd generation cephalosporins found at Community of Madrid. NG-MAST will allow us a better therapeutic management of patients with multidrug-resistant strains. PCR is a very useful technique inside microbiology laboratories for the detection of *C. trachomatis* and lymphogranuloma venereum. Sex gender is associated with the risk of infection by *M. hominis* and / or *U. urealyticum*.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) son una causa importante de enfermedad aguda, infertilidad y mortalidad. Según la OMS, cada año se producen en el mundo 448 millones de nuevos casos de ITS curables (sífilis, gonorrea, clamidiasis y tricomoniasis) en adultos de 15 a 49 años.

Chlamydia trachomatis (*C. trachomatis*) es el patógeno bacteriano de transmisión sexual más frecuente a nivel mundial. En Europa, en el año 2012, se declararon 20,6 millones de casos nuevos de infección^[1]. En EE.UU, se declararon 1.422.976 casos en el año 2012 (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 2012) y se estima una incidencia de aproximadamente 3 millones de casos nuevos/año en adolescentes y jóvenes adultos entre los 15 y los 24 años. En España, durante el año 2012, el Sistema de Información Microbiológica (SIM) notificó un total de 1.033 infecciones de transmisión sexual por *C. trachomatis*^[2]. La familia *Chlamydiaceae* son bacterias intracelulares obligadas. Comprende los géneros *Chlamydia* y *Chlamydophila*. El género *Chlamydia* comprende la especie *C. trachomatis* que es un patógeno exclusivo del ser humano, con un tropismo por el epitelio genital y conjuntival. *C. trachomatis* es el agente causal del tracoma, y de enfermedades de transmisión sexual como, uretritis, cervicitis, enfermedad inflamatoria pélvica y epididimitis ^[3-7]. Se han definido al menos 20 serotipos de *C. trachomatis*, los serotipos A, B, Ba y C se relacionan con el tracoma; los serotipos D-K con las infecciones perinatales y las transmitidas sexualmente. Los serotipos L1, L2, L2a, L2b y L3 producen el linfogranuloma venéreo (LGV) y la proctocolitis hemorrágica. Las cepas del LGV son más invasoras que los demás serotipos y producen afectación del tejido linfático^[6-10].

C. trachomatis es la causa del 20-55% de las uretritis no gonocócicas (UNG) en el hombre, siendo la mitad de los casos asintomáticos. ^[11-12]. En las mujeres la infección por *C. trachomatis* es con frecuencia asintomática. Cuando da síntomas se manifiesta como una cervicitis mucopurulenta que puede cronificarse o evolucionar a enfermedad pélvica inflamatoria ^[11-14]. Las infecciones perinatales pueden dar lugar a conjuntivitis y a neumonía ^[7, 15].

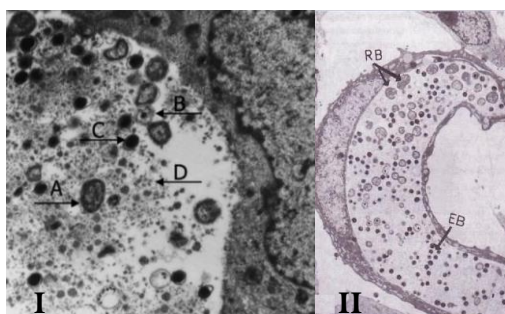


Figura1. (I) Inclusión madura de *C. trachomatis*, con cuerpos reticulados (A), formas intermediarias (B) y cuerpos elementales (C); también se observan gránulos de glucógeno en el interior de la misma (Twiki, Inc. Michael Ward, en línea, 28 de Mayo de 2014) (II) Inclusión tardía y madura de *C. trachomatis* que contiene cuerpos reticulados (RB) y cuerpos elementales (EB) (University of Connecticut, Central Web Server, en línea, 28 de Mayo de 2014).

El LGV es una enfermedad sexual causada por las serovariedades L1, L2 (genovariantes 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f y 2g) y L3 de *C. trachomatis*. Se caracteriza por lesiones ulcerativas en la mucosa genital o piel adyacente. Subsiguientemente aparece una linfadenopatía inguinal dolorosa que puede dar lugar a ulceración con desarrollo de elefantiasis e infertilidad^[12,13,16]. También produce una proctitis granulomatosa similar a la de la enfermedad de Crohn. La proctitis es frecuente en las mujeres con LGV como consecuencia de la extensión linfática desde el cérvix o desde la vagina. Se produce en varones tras coito anal o por diseminación linfática desde la uretra^[8]. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método diagnóstico de elección para la infección por *C. trachomatis* y la detección de los serotipos de LGV^[8]. Para el tratamiento de la infección por *C. trachomatis* se recomienda alguno de los regímenes expuestos en la tabla 1. ^[12,17,18]

La infección gonocócica es la segunda infección de transmisión sexual de etiología bacteriana más prevalente, tras la causada por *C. trachomatis*. En Europa, en 2008 se han declarado 3,4 millones de casos nuevos de infección por *N. gonorrhoeae*. En España, el sistema de enfermedades de declaración obligatoria (EDO) notificó 1.954 casos de infección por *N. gonorrhoeae* en el 2009, lo que representa una tasa de 4,33 por cada 100.000 habitantes. Desde 1995, año en que la tasa alcanzó el máximo de 11,69, se observó un claro descenso de la incidencia de la infección gonocócica, pero a partir de 2002 se advierte un incremento continuado ^[2,19]. Las especies de *Neisseria* son diplococos

gramnegativos aerobios y oxidasa-positivas. *N. gonorrhoeae* se diferencia de otras *Neisseria* por su capacidad de crecer en medios selectivos y de utilizar glucosa, pero no maltosa, sacarosa o lactosa [7-8]. La infección genital por *N. gonorrhoeae* en el hombre se presenta principalmente como uretritis[8]. En aproximadamente un 20% de los casos de uretritis existe coinfección de *N. gonorrhoeae* con *C. trachomatis*. En estos casos son frecuentes las descripciones de uretritis postgonócocicas como resultado de un enmascaramiento debido a que el período de incubación de *N. gonorrhoeae* es más corto (4 días) que el de *C. trachomatis* (7-14 días)[13]. *N. gonorrhoeae* es el principal agente de proctitis aguda en varones y mujeres que practican relaciones sexuales anales receptivas [7,20]. Se ha descrito la coexistencia de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* como causa de enfermedad pélvica crónica[11,12]. *N. gonorrhoeae* y *Chlamydia* pueden causar faringitis [12]. También pueden observarse infecciones diseminadas con septicemia e infecciones de la piel y de las articulaciones causadas por *N. gonorrhoeae*. [8]. *N. gonorrhoeae* puede producir *oftalmia neonatorum* en niños. Cerca de 4000 recién nacidos quedan ciegos cada año debido a infecciones maternas no tratadas por *N. gonorrhoeae* y *C. trachomatis*[1,12]. El diagnóstico de la infección por *N. gonorrhoeae* puede realizarse mediante PCR y cultivo en medios selectivos ya que requieren cistina y una fuente de energía (glucosa, piruvato o lactato); y muchas cepas han de ser complementadas con medios con aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas [8]. La tabla 1 muestra los regímenes recomendados para el tratamiento de la infección por *N. gonorrhoeae* [17, 21-23].

Tabla 1. Regímenes recomendados para el tratamiento de la infección por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*.

Regímenes recomendados		
	Infección por <i>C. trachomatis</i>	Infección por <i>N. gonorrhoeae</i>
CDC	Azitromicina 1 g oral/ dosis única. Ó: Doxiciclina 100 mg/ 2 veces al día durante 7 días	Ceftriaxona 250 mg + Azitromicina 1 g. Ó: Doxiciclina 100 mg/12h durante 7 días
IUSTI-WHO Europa	Azitromicina 1 g oral/ dosis única. Ó: Doxiciclina 100 mg/ 2 veces al día durante 7 días. Ó: Amoxicilina - clavulánico 500 mg/ 4 veces al día durante 7 días (Embarazo)	Ceftriaxona 250 mg + Azitromicina 2 g
BASHH/eCDC	Azitromicina 1 g oral/ dosis única. Ó: Doxiciclina 100 mg/ 2 veces al día durante 7 días	Ceftriaxona 500 mg + Azitromicina 1 g
American Academy of Pediatrics/ Mensa [17]	Eritromicina 50 mg/kg/d/ 4 dosis (Oftalmía neonatorum)	Nitrato de plata al 1% y pomadas oculares con 1% de tetraciclina ó 0,5% de eritromicina. (Quimioprolifaxis y tratamiento de la oftalmia del neonato).

Entre los micoplasmas (familia *Mycoplasmataceae*) hay 4 con patogenicidad bien establecida: *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis* y *Ureaplasma urealyticum*. Existen dos biovariedades de *U. urealyticum*, siendo la biovariedad 2 causa de UNG. No se ha encontrado relación entre la biovariedad 1 (*U. parvum*) y la UNG. *U. urealyticum* también ha sido implicado en prostatitis y epididimitis. *M. hominis* y *U. urealyticum* forman parte de la flora bacteriana de la vaginosis bacteriana [3,7,16,17,24-29]; *M. genitalium* es causa de uretritis, cervicitis y enfermedad pélvica y ha sido identificado en aproximadamente un 7,3% de mujeres en poblaciones de alto riesgo [30,31]. Mientras que el *M. hominis* y *Ureaplasma* crecen bien en cultivo, *M. genitalium* lo hace con dificultad, por lo que hay que usar técnicas moleculares para su diagnóstico [7,17,20,32,33]. *M. hominis* y *U. urealyticum* han sido identificados como causa de la enfermedad inflamatoria pélvica en mujeres sin infectar por *N. gonorrhoeae* ni por *C. trachomatis* [6,7]; sin embargo, la patogenicidad de *U. urealyticum* es dudosa, ya que puede encontrarse en la flora vaginal normal de la mujer sana [17]. La eritromicina y las tetraciclinas se usan para tratar las infecciones por *Ureaplasma*. El tratamiento de elección de los Micoplasmas es doxiciclina (100mg/12h oral, 7-15 días); al contrario de otros micoplasmas, *M. hominis* es resistente a la eritromicina y el 20% de las cepas a las tetraciclinas. Otras alternativas de tratamiento son clindamicina, azitromicina, levofloxacino o ciprofloxacino [17].

2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo general de este trabajo de fin de máster es la determinación de la resistencia antibiótica a *N. gonorrhoeae* y el estudio de la prevalencia de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* a nivel global y local. Además, otro de los objetivos de este estudio fue la determinación de la prevalencia de *M. hominis* y *U. urealyticum*. Para ello, se usaron diferentes métodos diagnósticos, como: PCR en tiempo real, genotipado de linfogranuloma venéreo (LGV) y siembra en cultivos.

Los resultados obtenidos por las diferentes técnicas se sometieron a un análisis estadístico (R-GNU Project).

Para cumplir este objetivo, se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

- 1º. Estudio de la prevalencia de *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* según edad, sexo y región/país de origen durante los años 2000 – 2013.
- 2º. Determinación de la resistencia antibiótica a *N. gonorrhoeae*.
- 3º. Estudio de la prevalencia de *M. hominis* y *U. urealyticum* durante los años 2000-2013.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Población, muestra y estudio de susceptibilidad.

Se analizaron 4.140 muestras de exudados uretrales, endocervicales y/o ano-rectales para la detección de infección por *C. trachomatis* y 9.232 muestras para la detección de *N. gonorrhoeae*, *U. urealyticum* y *M. hominis*. Las muestras procedían de pacientes de Ginecología, Urgencias, Enfermedades Infecciosas, y otras consultas de la Fundación Jiménez Díaz. La población incluyó pacientes de los siguientes grupos etarios: < de 25, 25 a 45 y > de 45 años. Se estudiaron menos muestras para *C. trachomatis* porque la técnica de PCR se introdujo posteriormente. Las muestras fueron tomadas con hisopos con medio de transporte Amies para *N. gonorrhoeae* y otras bacterias y con un hisopo de aluminio y viscosa sin medio de transporte para *C. trachomatis* (DELTALAB®).

La identificación de *C. trachomatis* se realizó mediante PCR, que se hizo siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (HAIN, Lifescience). Para el aislamiento de *N. gonorrhoeae*, se usaron los medios de cultivo VCA3, PVX y TSS (bioMérieux); incubados a 35°C en 5% de CO₂ durante 72 horas (Thermo Scientific Steri-Cycle Incubator). *N. gonorrhoeae* fue identificada mediante MALDI-TOF MS (Vitek® MS Prep Station V2.3.2; bioMérieux).

El estudio de sensibilidad de *N. gonorrhoeae* a tetraciclina se realizó mediante difusión en medio PVX y se utilizaron tiras de E-test para determinar las CMI de penicilina G, ciprofloxacino y ceftriaxona. Además, desde Octubre de 2013, los aislados de *N. gonorrhoeae* se enviaron al Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda (CNM), donde estudiaron la producción de betalactamasa y la sensibilidad a penicilina G, ceftriaxona, cefixima, tetraciclina, ciprofloxacino, gentamicina, espectinomicina y azitromicina. La interpretación de la sensibilidad se hizo según los criterios del CLSI^[34] (tabla 4) y del EUCAST^[35]. Según los criterios de EUCAST^[35] se consideraron sensibles a la azitromicina las cepas de *N. gonorrhoeae* con una CMI ≤0,25 mg/L y resistentes CMI >0,5 mg/L.

La caracterización molecular de las cepas se realizó mediante el sistema de tipificación NG-MAST (*N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing) que asigna diferentes secuencias tipo (STs) en base a las variaciones en fragmentos

de las secuencias de 2 genes hipervariables, el gen de la porina PorB (*porB*) y el gen de la subunidad B de la proteína de unión a transferrina (*tbpB*).

Tabla 4. *N. gonorrhoeae*: Interpretación de las CMI según el CSLI.

<i>N. gonorrhoeae</i>: Interpretación de las CMI según el (CLSI)		
Agente antimicrobiano	CMI (µg/mL)	
	R	S
Penicilina G	≥2	≤0,06
Ceftriaxona	-	≤0,25
Cefixima	-	≤0,25
Tetraciclina (*)	≥2	≤0,25
Ciprofloxacino	≥1	≤0,06
Espectinomicina	≥128	≤32
CMI: Concentración mínima inhibitoria. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. (*)También se consideró sensible un diámetro del halo de inhibición ≥38 mm, intermedio un diámetro del halo de inhibición= 31-37 mm y resistente un diámetro del halo de inhibición ≤30 mm		

Para detectar *U. urealyticum* y *M. hominis*, se procedió al cultivo en caldo urea-arginina y en agar A7 (bioMerieux), a 35°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 72 horas. *U. urealyticum* y *M. hominis* se identificaron en base a su crecimiento y aparición de colonias características en los medios selectivos.

3.1. Análisis estadístico.

Las asociaciones han sido evaluadas mediante la prueba de Chi-cuadrado o en su defecto mediante la prueba exacta de Fisher. Para evaluar el grado de asociación se ha calculado la ODDS ratio junto con su intervalo de confianza al 95%. El nivel de significación estadística se estableció cuando el valor de p fue inferior a 0,05. Los análisis estadísticos se han realizado con el software estadístico R versión 3.0.1 (R-GNU Project, Free Software Foundation, USA).

4. RESULTADOS.

Entre enero de 2009 y marzo de 2014, se investigó la presencia de *C. trachomatis* en 4.140 muestras. En 541 casos fue positivo: 406 uretrales (75,0%), 109 endocervicales (20,1%), 13 rectales (2,4%), 6 vaginales (1,1%) y 7 (1,4%) orinas. Se detectaron 6 casos concurrentes con LGV (2,8%) y 36 con *N. gonorrhoeae* (6,7%). La serovariedad de LGV fue L2/L2a. Un caso de LGV fue concurrente con *N. gonorrhoeae*. 426 (78,7%) casos se detectaron en varones y 115 (21,3 %) en mujeres. En la tabla 5, se observan los datos de los aislamientos de *C. trachomatis* y las variables de los pacientes.

Tabla 5. Análisis univariante de la asociación entre los aislamientos de *C. trachomatis* y las variables de los pacientes.

	Aislamientos de <i>C. trachomatis</i>	
	(n)	(%)
Edad		
<25	97	17,9
25-45	418	77,3
>45	26	4,8
Sexo		
Hombre	426	78,7
Mujer	115	21,3
Región o país de origen		
España/América Latina	462	85,4
Norteafricano/magrebí	11	2,0
Subsahariano	2	0,4
Asiático	12	2,2
Brasil	1	0,2
Otros orígenes	50	9,2
LGV concurrente^(*)		
Sí	6	2,8
No	207	97,2
Serovariedad del LGV^(*)		
Sí (L2/L2a)	6	2,8
No	207	97,2
Gonorreia concurrente		
Sí	36	6,7
No	505	93,3
Los datos son números de personas. LGV = Linfogranuloma venéreo. Otros orígenes: turcos, rumanos, italianos, búlgaros, holandeses, franceses, macedonios y rusos. (*) Aislamientos de LGV en 213 muestras analizadas entre agosto de 2013 a marzo de 2014.		

Como se observa en la figura 2., hay un incremento clínicamente significativo de casos de infección por *C. trachomatis* de 2009 a 2013.

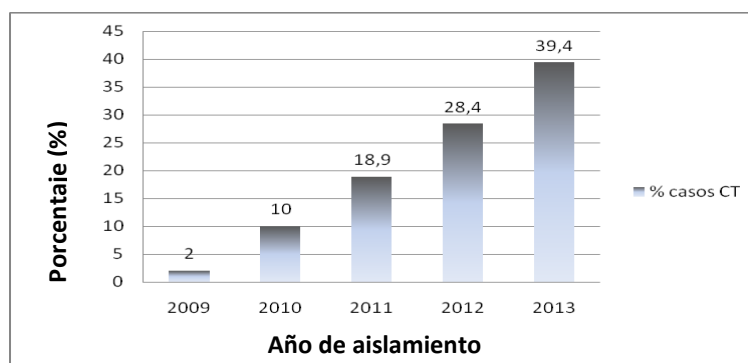


Figura 2. Porcentaje de aislados de *C. trachomatis* (muestras genitales), período 2009-2013.

Entre enero de 2000 y marzo de 2014, se investigó la presencia de *N. gonorrhoeae* en 9.232 muestras. Se aislaron 506 cepas, 499 en varones (98,6%) y 7 en mujeres (1,4%). En la tabla 6, se observan los datos de la asociación entre los aislamientos de *N. gonorrhoeae* y las variables de los pacientes:

Tabla 6. Análisis univariante de la asociación entre los aislamientos de *N. gonorrhoeae* y las variables de los pacientes.

	Aislamientos de <i>N. gonorrhoeae</i>	
	(n)	(%)
Edad		
<25	58	11,5
25-45	395	78
>45	53	10,5
Sexo		
Hombre	499	98,6
Mujer	7	1,4
Región o país de origen		
España/América Latina	423	83,6
Norteafricano/magrebí	24	4,7
Subsahariano	9	1,8
Asiático	9	1,8
Brasil	11	2,2
Otros orígenes	30	5,9
Los datos son números de personas.		
Otros orígenes: turcos, rumanos, italianos, búlgaros, holandeses, franceses, macedonios y rusos.		

El 99,4% de las cepas (503 casos) fueron sensibles a la ceftriaxona y un 0,6% de las cepas (3 casos) resistentes. Las 19 cepas estudiadas en el CNM fueron sensibles a ceftriaxona y 1 (5,3%) fue resistente a cefixima. El 69% de las cepas (349 casos) fueron resistentes a penicilina, el 28% (140 casos) sensibles y el 3% (17 casos) presentaron sensibilidad intermedia. De las 19 cepas estudiadas en el CNM, 1 (5,3%) fue sensible a penicilina, 9 (47,4%) resistentes y 9 (47,4%) presentaron sensibilidad intermedia. El 51,8% de las cepas (262 casos) fueron

resistentes a tetraciclina y el 47,4% (240 casos) sensibles. De las 19 cepas estudiadas en el CNM, 6 (31,6%) fueron sensibles a tetraciclina y 13 (68,4%) resistentes. El 54,7% de las cepas (277 casos) fueron sensibles a ciprofloxacino y el 44,3% (224 casos) resistentes. Ni el sexo, ni la edad ni el grupo étnico se asoció con que el aislado fuera sensible o resistente al antibiótico (valores de p superiores a 0,05) (tabla 8). De las 19 cepas estudiadas en el CNM, 7 (36,8%) fueron sensibles a ciprofloxacino, 11 (57,9%) resistentes y 1 (5,3%) presentó sensibilidad intermedia. En la FJD no se estudió la susceptibilidad a aminoglucósidos ni macrólidos, pero en las 19 cepas estudiadas en Majadahonda el 100% fueron sensibles a gentamicina y espectinomicina y el 63,2% fueron sensibles a azitromicina y un 36,8% presentaron sensibilidad intermedia. De las 19 cepas estudiadas en el CNM el 89,5% (17 casos) fueron betalactamasa negativas y el 10,5% (2 casos) betalactamasa positivas. El 100% de las cepas pertenecieron a la serovariedad IB.

Las comparaciones de las frecuencias de sensibilidad y resistencia, según el sexo y la edad han sido hechas únicamente en el grupo de los españoles/latinoamericanos para la penicilina G, la tetraciclina y al ciprofloxacino, como se observa en tabla 8, porque solamente en este grupo étnico hay un número elevado de pacientes que permite el cálculo de variables estadísticas. Se halló una asociación estadística (valores de p inferiores a 0,05) entre la resistencia a penicilina y personas mayores de 45 años: el riesgo de resistencia a este antibiótico es menor en el grupo de personas mayores de 45 años comparado con los demás grupos etarios (tabla 8).

Tabla 8. Susceptibilidad de *N. gonorrhoeae* a 3 antibióticos distintos, según el sexo y la edad.

Sensibilidad y Resistencia a la Penicilina					
	S	R	OR	IC 95%	p
Sexo					
Hombre	120 (29,7)	284 (70,3)			
Mujer	1 (14,3)	6 (85,7)	2,54	0,30-21,3	0,68
Edad					
<25	11(22,9)	37 (77,1)			
25-45	90 (28,6)	225 (71,4)	0,74	0,36-1,52	0,42
>45	20 (41,7)	28 (58,3)	0,42	0,17-1,01	0,05
Sensibilidad y Resistencia a la Tetraciclina					
	S	R	OR	IC 95%	p
Sexo					
Hombre	202 (48,9)	211 (51,1)			
Mujer	2 (28,6)	5 (71,4)	2,49	0,46-12,48	0,45
Edad					
<25	23 (47,9)	25 (52,1)			
25-45	154 (47,4)	171 (52,6)	1,02	0,56-1,87	0,95
>45	27 (57,4)	20 (42,6)	0,68	0,30-1,53	0,35
Sensibilidad y Resistencia al Ciprofloxacino					
	S	R	OR	IC 95%	p
Sexo					
Hombre	226 (55,0)	185 (45,0)			
Mujer	4 (57,1)	3 (42,9)	0,92	0,20-4,15	1,00
Edad					
<25	23 (46,9)	26 (53,1)			
25-45	180 (55,9)	142 (44,1)	0,70	0,38-1,28	0,24
>45	27 (57,4)	20 (42,6)	0,66	0,29-1,47	0,30
S= Sensible; R= Resistente. OR = Odds ratio. IC = Intervalo de confianza. p =probabilidad. Los datos son datos contables. Los valores entre paréntesis representan porcentajes de aislamientos de cada categoría de la columna.					

La tipificación molecular mediante NG-MAST se llevó a cabo en un total de 19 cepas de *N. gonorrhoeae* (tabla 9). El ST más prevalente fue el ST21 (3 casos; 15,8%). La única cepa resistente a cefixima pertenecía a ST3158, el cual comparte el alelo *porB* (1914) con el ST9808. Las demás cepas resistentes a penicilina G pertenecieron a los ST4995, ST3158, ST21, ST10026, ST9971, ST3378 y ST2018. Las cepas resistentes a tetraciclina pertenecieron a los ST1780, ST2992, ST8433, ST9973, ST21 y ST292. El ST292 comparte el alelo *porB* (28) con el ST9973. Las cepas resistentes a ciprofloxacino pertenecieron a los ST2, ST3158, ST21, ST9808, ST10026, ST9971, ST3378, ST7232, ST2018 y ST4995. Una de las dos cepas pertenecientes al ST4995 fue sensible al ciprofloxacino. Respecto a la azitromicina, 13 cepas fueron sensibles (68,4%) y 6 (31,6%) presentaron sensibilidad intermedia. Las 6 cepas con sensibilidad intermedia a azitromicina pertenecieron a los ST1780, ST2992, ST3158, ST9973, ST3378 y ST2018. Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a gentamicina y espectinomicina. Los ST8433, 4995, 9971, 9973, 9974, 9808, 10026 y 2018

fueron de nueva descripción. Las 19 cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas en el CNM procedían de varones españoles/latinoamericanos heterosexuales con síntomas de uretritis (ST1780, ST2992, ST8433, ST4995, ST2, ST3158, ST9973, ST21, ST9974, ST9808, ST10026, ST292, ST9971, ST7232 y ST2018) e infección diseminada (ST3378).

Tabla 9. Distribución de los ST en las 19 cepas estudiadas de *N. gonorrhoeae*.

ST (número de aislados)	Sensibilidad antimicrobiana ^a					Alelo		
	CRO	CFX	PNG	TET	CIP	AZT	porB	tbpB
1780 (1)	S	S	I	R	S	I	1143	39
2992 (1)	S	S	I	R	S	I	1808	29
8433 (1)	S	S	I	R	S	S	1489	263
4995 (1)	S	S	R	S	S	S	3031	33
2 (1)	S	S	I	S	R	S	2	16
3158 (1)	S	R	R	S	R	I	1914	110
9973 (1)	S	S	I	R	S	I	28	138
21 (1)	S	S	S	S	S	S	14	33
21 (1)	S	S	I	R	R	S	14	33
21 (1)	S	S	R	S	S	S	14	33
9974 (1)	-	-	-	-	-	-	3957	1388
9808 (1)	S	S	I	S	R	S	1914	33
10026 (1)	S	S	R	S	R	S	5877	110
292 (1)	S	S	I	R	I	S	28	4
9971 (1)	S	S	R	S	R	S	5878	137
3378 (1)	S	S	R	S	R	I	2043	110
7232 (1)	S	S	I	S	R	S	1489	1388
2018 (1)	S	S	R	S	R	I	182	29
4995 (1)	S	S	R	S	R	S	3031	33

R: Resistente; **S:** Sensible; **I:** Sensibilidad intermedia.^(a) Resultados interpretados según criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). CRO: Ceftriaxona; CFX: Cefixima; PNG: Penicilina G. TET: Tetraciclina; CIP: Ciprofloxacino; AZT: Azitromicina.

Entre enero de 2000 y marzo de 2014, se investigó la presencia de *U. urealyticum* y de *M. hominis* en 9.232 muestras. Se aislaron 504 cepas, 312 (61,9%) de mujeres y 192 (38,1%) de hombres; hubo 297 muestras endocervicales (58,9%) y 207 uretrales (41,1%).

Tabla 13. Analisis univariante de la asociación entre los aislamientos de *U. urealyticum* y *M. hominis* y las variables de los pacientes.

		Aislamientos (n total =504)			
	N	P	OR	IC 95%	p
<i>Ureaplasma urealyticum</i>					
Sexo					
Hombre	25(13,0)	167(87,0)			
Mujer	110(35,3)	202(64,7)	0,28	0,17-0,44	0,00
Región o país de origen					
España/América Latina	122(27,1)	328(72,9)			
Asiático	2(40,0)	3(60,0)	0,56	0,10-3,38	0,62
Norteafricano/magrebí	2(13,3)	13(86,7)	2,42	0,54-10,87	0,37
Otros orígenes	7(24,1)	22(75,9)	1,17	0,49-2,81	0,83
Subsaharianos	2(50,0)	2(50,0)	0,37	0,05-2,67	0,30
Brasil	0	1(100,0)			
<i>Mycoplasma hominis</i>					
Sexo					
Hombre	181(94,3)	11(5,7)			
Mujer	249(79,8)	63(20,2)	4,16	2,13-8,12	0,00
Región o país de origen					
España/América Latina	382(84,9)	68(15,1)			
Asiático	3(60,0)	2(40,0)	3,75	0,61-22,83	0,17
Norteafricano/magrebí	14(93,9)	1(6,7)	0,40	0,05-3,10	0,71
Otros orígenes	26(89,7)	3(10,3)	0,65	0,19-2,20	0,60
Subsaharianos	4(100,0)*	0*			
Brasil	1(100,0)	0			
<i>UU concurrente con MH</i>					
Sexo					
Hombre	178(92,7)	14(7,3)			
Mujer	265(84,9)	47(15,1)	2,26	1,21-4,22	0,01
Región o país de origen					
España/América Latina	396(88,0)	54(12,0)			
Asiático	5(100,0)	0			
Norteafricano/magrebí	14(93,3)	1(6,7)	0,52	0,07-4,06	1,00
Otros orígenes	25(86,2)	4(13,8)	1,17	0,40-3,50	0,77
Subsaharianos	2(50,0)	2(50,0)	7,33	1,01-53,14	0,08
Brasil	1(100,0)	0			
N=Negativo; P=Positivo. UU = <i>U. urealyticum</i> ; MH = <i>M. hominis</i> . Otros orígenes: turcos, rumanos, italianos, búlgaros, holandeses, franceses, macedonios y rusos. (*) El MH no es el único patógeno causal de la infección; 2 de los 4 subsaharianos presentan infección mixta por MH y UU. Los datos son datos contables. Los valores entre paréntesis representan porcentajes de aislamientos de cada categoría de la columna.					

Como se observa en tablas 13 y 14, el riesgo de infección por *U. urealyticum* fue casi un 20% más bajo en mujeres que en hombres (OR=0,28; IC 95%, 0,17-0,44; p=0,00). El riesgo de infección por *M. hominis* fue casi cuatro veces mayor en las mujeres que en los hombres (OR=4,2%; IC 95%, 2,13-8,12, p=0,00). Respecto a las infecciones mixtas por *U. urealyticum* y *M. hominis*, las mujeres presentan un riesgo de sufrir infección mixta casi dos veces superior a los hombres (OR=2,26; IC 95%, 1,21-4,22; p=0,01). Cabe señalar que, estas asociaciones estadísticas solamente son válidas si consideramos que todas las muestras analizadas procedían de pacientes sintomáticos. Una de las limitaciones

de este estudio ha sido la falta de datos respecto a la procedencia de las muestras, al no ser posible discriminar las muestras procedentes de pacientes sintomáticos de las muestras solicitadas para el cribado.

Tabla 14. Análisis de la asociación entre los aislamientos de *U. urealyticum* y *M. hominis* en el grupo étnico de los españoles/latinoamericanos y el sexo.

		<u>Aislamientos positivos en el grupo de los españoles/latinoamericanos (n total =504)</u>			
		P	OR	IC 95%	p
<i>Ureaplasma urealyticum</i>					
Sexo					
Hombre	141(87,0)				
Mujer	187(64,9)		0,28	0,16-0,46	0,00
<i>Mycoplasma hominis</i>					
Sexo					
Hombre	9(5,6)				
Mujer	59(20,5)		4,38	2,11-9,10	0,00
<i>UU concurrente con MH</i>					
Sexo					
Hombre	12(7,4)				
Mujer	42(14,6)		2,13	1,09-4,18	0,02
N=Negativo; P=Positivo. UU = <i>Ureaplasma urealyticum</i> ; MH = <i>Mycoplasma hominis</i> . Los valores entre paréntesis representan porcentajes de aislamientos de cada categoría de la columna.					

5. Discusión.

La infección por *C. trachomatis* es un problema de salud pública. En Europa su incidencia es ascendente, con cifras de 100 casos por 100.000 habitantes^[36]. Nosotros hemos detectado 541 casos, siendo el mayor porcentaje en varones (78,7%) respecto a las mujeres (21,3%), probablemente debido a que, en mujeres, esta infección suele ser asintomática. Observamos un incremento de casos desde 2009 a 2013. Esto no implica un aumento real de casos, ya que la PCR se instituyó de forma paulatina en este centro a partir de 2009, disminuyendo el número de casos no diagnosticados en relación a los años previos a la implementación de la técnica en este Servicio. Estos datos ponen de manifiesto que, cuando se proporcionan a los clínicos herramientas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas por parte de los laboratorios de microbiología, estos las utilizan de forma correcta mejorando el manejo de sus pacientes. Se constató que la mayoría de varones y mujeres con infección por *C. trachomatis* tienen entre 25 y 45 años (77,3%). En un estudio realizado en Ghana ^[37] la mayoría de casos en mujeres ocurrió entre los 15-19 años, debido probablemente a que en Ghana, las jóvenes < de 25 años están más expuestas a prácticas sexuales sin uso de condones, por falta de recursos y/o limitaciones en la educación sexual.

En un estudio realizado en Cataluña ^[38], se informó un porcentaje superior de casos en < de 25 años (53,4%) respecto a >de 25 años (46,6%), diferencia estadística significativamente ($p=0,005$). Nuestros datos en personas entre 25-45 años y los hallados en Cataluña (46,6%) ^[38] no mostraron diferencias significativas. En nuestro estudio, hemos obtenido un mayor porcentaje de casos en hombres (en todos grupos etarios) lo que difiere del estudio de Asturias ^[39], donde se obtuvieron prevalencias similares de infección en ambos sexos. Esto se debe, probablemente, a diferencias en el tamaño muestral, en el perfil de los pacientes atendidos y factores socioeconómicos, entre otros. Respecto a infecciones en hombres, el porcentaje de casos hallados en este estudio (78,7%) es superior al obtenido en otros centros españoles (Pontones) (16,8%) ^[24] y en Argentina (4,1%) ^[40]. El porcentaje de casos de infección por *C. trachomatis* concurrente con gonorrea (6,7%) concuerdan con los obtenidos en Pontones ^[24], (4,8%). Respecto a infecciones en mujeres, el porcentaje total de casos hallados (21,3%) es similar al obtenido en Holanda (19,6%) ^[41] y ligeramente más alto que

los obtenidos en Argentina (13,7%) ^[40] y en Chile (11,49%) ^[42], donde existe, probablemente, un mayor número de casos silentes, lo que aumentaría el riesgo de complicaciones (enfermedad inflamatoria pélvica o embarazo ectópico) en esas poblaciones. Este factor debe tenerse en cuenta en España, sobre todo en el cribado de infecciones por *C. trachomatis* en mujeres inmigrantes en edad sexualmente activa provenientes de zonas endémicas. Con relación a la región de origen, el mayor porcentaje de casos fue en españoles/latinoamericanos (85,4%) seguido del grupo de otros orígenes étnicos (turcos, rumanos, italianos, búlgaros, holandeses, franceses, macedonios y rusos) con un 9,2% de los casos. Este estudio nos ha permitido conocer el perfil étnico y etario de varones y mujeres adscritos a este centro hospitalario y que tienen clamidiasis, LGV u otras ITS.

El LGV es endémico en África, sudeste Asiático y el Caribe, pero en los últimos años se han descrito casos en Europa, sobre todo en varones homosexuales a veces coinfectados por HIV ^[43,44]. En España, se han descrito 2 casos de LGV-2b, uno de ellos en un varón homosexual, que refirió como factor de riesgo una pareja de origen sudamericano ^[13,36]. En este estudio se describen 6 casos de LGV-2/2a en muestras de varones homosexuales españoles/latinoamericanos de entre 25-45 años de edad con proctitis. Estos datos permiten conocer la distribución de los genotipos circulantes de LGV en un área de la Comunidad de Madrid, resaltando la alta prevalencia del genotipo LGV 2/2a. Hasta la fecha, este es el primer estudio realizado en la Comunidad de Madrid sobre la distribución genotípica de LGV en varones y mujeres según su región/país de origen y edad. La implementación de técnicas de genotipado de LGV en hospitales permitirá obtener una información epidemiológica detallada que permita mejorar el control y la atención terapéutica de la enfermedad.

Desde enero de 2000 a marzo de 2014, hemos aislado un total de 506 cepas de *N. gonorrhoeae* (5,5% del total de 9.232 muestras estudiadas). Este porcentaje (5,5%) fue similar al hallado en Pontones (7,4%)^[24] y muy inferior a los obtenidos en Brasil (43%) ^[45], debido a que en Brasil se centró el estudio en una población de pacientes que atienden a un hospital de referencia exclusivo de ITS^[45]. Se aisló un 98,6% de cepas de *N. gonorrhoeae* en varones y un 1,4% en mujeres, debido a que los varones suelen presentar una sintomatología aguda y acuden más a este centro, mientras que las mujeres suelen ser asintomáticas y

por ello acuden menos. Respecto a los varones, el porcentaje hallado (98,6%) es similar a los obtenidos en Zimbabwe (83,3%) y en Perú (87,5%), China (100,0%) y Rusia (100,0%)^[46] e inferior al obtenido en Mozambique (35%)^[47]. Respecto a las mujeres, el porcentaje hallado (1,4%) es similar a los obtenidos en Sudán (1,8%)^[48] y muy inferior a los obtenidos en India (66,7%), Perú (83,3%), Zimbabwe (93,3%), China (100,0%), Rusia (100,0%)^[46] y en Mozambique (11%)^[47]. Estas diferencias reflejan, probablemente, diferencias socioeconómicas y culturales en las poblaciones estudiadas. El mayor número de casos en nuestro estudio se observó en españoles/latinoamericanos (83,6%), debido a que los latinos constituyen el mayor número de inmigrantes que han venido a este Centro. Este ha sido el primer estudio a nivel de la Comunidad de Madrid de casos de infección por *N. gonorrhoeae* según la región de origen y es útil para trazar el perfil epidemiológico de los pacientes afectados por esta enfermedad y que acuden o están adscritos a este centro hospitalario. La producción de betalactamasa de las cepas de *N. gonorrhoeae* estudiadas en el CNM (10,5%) fue similar al porcentaje observado en Pontones (11,8%)^[24]. El porcentaje de resistencia a penicilina obtenido (69%) fue muy superior al obtenido en Pontones (11,8%)^[24] y similar a los obtenidos en Mozambique (63,6%)^[49], Vietnam (48%)^[50], India, Pakistán y Bután (68%)^[21] y superior a los obtenidos en Brasil (22,4%)^[45] y Malawi (19%)^[51] y (69%) es inferior al obtenido en Etiopia (86,6%)^[52], debido a diferencias en el tipo de paciente estudiado y terapia antibiótica empleada en esas áreas. El riesgo de aislar *N. gonorrhoeae* resistente a penicilina en españoles/latinos fue 40% más bajo en mayores de 45 años que en menores de 25 años (OR= 0,42; IC 95%, 0,17-1,0; p=0,05) (tabla 8). Nosotros no encontramos resistencias frente a amoxicilina-clavulánico, algo raro, como ha sido publicado en Pontones^[24], con sólo un 1,4% de cepas resistentes. Los resultados hallados en nuestro estudio concuerdan con los obtenidos en el CNM, una vez que también se observó un alto porcentaje de resistencia de los aislados a la penicilina (47,4%). Este estudio avala el empleo de la ceftriaxona como tratamiento de 1ª elección de la infección por *N. gonorrhoeae* ya que el 99,4% de las cepas presentaron una CMI $\leq 0,25$ mg/L y solamente un 0,6 % presentó una sensibilidad disminuida a la ceftriaxona (CMI $\geq 0,25$ mg/L). El porcentaje de sensibilidad obtenido en nuestro Servicio (99,4%) es similar al obtenido en Pontones (100%)^[24]. El porcentaje de resistencia a ceftriaxona (0,6%) es similar a los hallados en Barcelona (1%)^[19] y

muy inferior a los obtenidos en Etiopia (4,2%)^[52], Vietnam (5%)^[50] y China (17,9%)^[53]. Las cefalosporinas de 3ª generación mantienen por el momento su efectividad, aunque se han detectado algunos casos de sensibilidad disminuida y fallos de tratamiento con cefixima en países como Inglaterra, España y Malawi ^[19,54,55]. El aumento de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a cefalosporinas de 3ª es todavía infrecuente en España, pero puede que estos casos sean los primeros detectados en la Comunidad de Madrid. El porcentaje de resistencia al ciprofloxacino, fue del 44,3% lo que concuerda con el obtenido en Barcelona (53%)^[19]. Los resultados hallados en nuestro estudio concuerdan con los obtenidos en el CNM, donde también se observó un alto porcentaje de resistencia a ciprofloxacino (57,9%). Asimismo, nuestro porcentaje de resistencia fue superior a los hallados en Pontones (23,6%) ^[24], Sudáfrica (29,2%), Kenia (25,6%)^[23] y Brasil (21,4%)^[45], e inferior a los porcentajes obtenidos en Vietnam (98%)^[50] y en India, Pakistán y Bután (93,8%)^[21]. Esto se debe al tipo de paciente y al modo de empleo de antibióticos en esas áreas. El porcentaje de sensibilidad a azitromicina hallado en el CNM fue del 63,2%, lo que concuerda con los resultados hallados en Barcelona (96%)^[19], Vietnam (62%)^[50], (77,6%)^[45] y en India, Pakistán y Bután (76,9%)^[21]. La azitromicina constituye una buena alternativa para el tratamiento de las infecciones gonocócicas no complicadas en pacientes con alergia documentada a penicilinas o cefalosporinas ^[19]. El porcentaje de resistencia a la tetraciclina, fue del 51,8% lo que concuerda con los resultados obtenidos en India, Pakistán y Bután (55%)^[21], en Mozambique (63,6%) ^[49] y en Brasil (32,3%)^[45]. Sin embargo, este porcentaje (51,8%) es más elevado que el hallado en Pontones (8,3%) ^[24]; debido a diferencias en el tipo de paciente estudiado. El porcentaje de sensibilidad a gentamicina y espectinomicina hallado en el CNM fue del 100%, lo que concuerda con los resultados obtenidos en Barcelona (99%)^[19], Vietnam (100%)^[50] y en India, Pakistán y Bután (100%)^[21]. En esos países los aminoglucósidos siguen siendo una buena opción de tratamiento. Sin embargo en países como Etiopia y Mozambique, se ha observado un 14,1% y 7,2% de resistencia a la gentamicina ^[23], lo que puede deberse al uso continuo de este aminoglucósido como uno de los agentes de 1ª línea en el tratamiento empírico.

No se han encontrado asociaciones significativamente estadísticas entre la resistencia de los aislados de *N. gonorrhoeae* y el sexo y el grupo etario y la región/ el país de origen de los pacientes (tabla 8).

En 2013, el GRASP reportó que en Inglaterra hubo un aumento de cepas de *N. gonorrhoeae* con sensibilidad disminuida a la cefixima durante los años 2007 a 2010 [56]. Estudios hechos en España demostraron que la población de gonococos con sensibilidad reducida y/o resistentes a la ceftriaxona y a la cefixima pertenecen a la ST 1407, siendo la más prevalente aquí y en el resto de Europa [19]. Las 19 cepas de *N. gonorrhoeae* caracterizadas en el servicio de Microbiología del CNM presentaron una CMI $\leq 0,25$ mg/L a la ceftriaxona y ninguna de ellas perteneció al ST 1407. Pese que exista una diversidad de STs de *N. gonorrhoeae* dentro de las 19 cepas estudiadas, el ST21 y el ST4995 fueron los más predominantes. Las cepas pertenecientes al ST21 fueron sensibles a ceftriaxona, cefixima y azitromicina; lo que concuerda con los resultados hallados por Serra –Pladevall y col^[19]. La única cepa resistente a la cefixima pertenece al ST3158, que comparte el alelo del gen *tbpB* (alelo 110) con 12 cepas pertenecientes al ST1407 identificadas por Serra-Pladevall y col^[19] y únicamente se diferencian en el alelo del gen *porB* (alelo 1914, respectivamente). Puede que el ST3158 haya surgido a partir del ST epidémico ST1407 con el cual comparte niveles bajos de sensibilidad a la cefixima. La cepa perteneciente al ST3378 también comparte el alelo del gen *tbpB* (alelo 110) con el ST1407 identificado por Serra-Pladevall y col^[19] y únicamente se diferencian en el alelo del gen *porB* (alelo 2043, respectivamente); sin embargo, el ST3378 no presenta resistencia a cefixima al igual que 5 cepas pertenecientes al ST1407 identificadas esos autores [19]. Existe una asociación significativa entre los ST1407 y ST2992 y varones homosexuales [57]. En este estudio, la única cepa perteneciente al ST2992 fue sensible a ceftriaxona y cefixima y tuvo una sensibilidad intermedia a la azitromicina. Estos resultados son similares a los obtenidos por Serra y col^[19] y únicamente se diferencian porque sus cepas fueron todas sensibles a la azitromicina. El ST7232 fue sensible a ceftriaxona, cefixima y azitromicina; lo que concuerda con los resultados obtenidos por Serra- Pladevall y col^[19]. Este estudio avala el empleo de la azitromicina como antibiótico de 2ª o 3ª línea, puesto que, 13 de las 19 cepas estudiadas (68% del total de las 19 cepas caracterizadas) fueron sensibles a la misma. Uno de los aspectos interesantes de la caracterización poblacional de las 19 cepas estudiadas es la detección de 10 cepas resistentes a ciprofloxacino, pertenecientes a 5 STs nuevos (ST2018, ST4995, ST9808, ST9971 y ST10026) y a 5 STs conocidos (ST2, ST21, ST3158,

ST3378 y ST7232) y de 1 cepa con sensibilidad intermedia perteneciente al ST292. La cepa perteneciente al ST2 fue resistente al ciprofloxacino y la perteneciente al ST292 presentó una sensibilidad intermedia a ciprofloxacino; lo que no concuerda con los resultados obtenidos por otros autores [58,59]. La cepa perteneciente al ST3378 fue resistente al ciprofloxacino, lo que concuerda con resultados obtenidos por Endiami y col [58]. Pese a que las fluoroquinolonas ya no son empleadas como agentes de 1ª línea el estudio de susceptibilidad de cepas de *N. gonorrhoeae* mediante NG-MAST permitirá un mejor manejo terapéutico en el futuro de pacientes con cepas multirresistentes.

Desde Enero de 2000 a Marzo de 2014, se aislaron un total de 504 cepas de *U. urealyticum* y *M. hominis* (5,5% del total de 9.232 muestras estudiadas). El porcentaje de *U. urealyticum* y *M. hominis* fue del 73,2% y 14,7%, respectivamente; datos similares a los obtenidos en Holanda^[29] (84,4% y 15,6%, respectivamente) e inferiores a los hallados en Sudán^[48] (6,9% y 13,8%, respectivamente). El porcentaje de infección mixta por *U. urealyticum* y *M. hominis* obtenido (12,1%) fue similar al hallado en Pontones (9,5%)^[24]; esto confirma la frecuente asociación de estos microorganismos en uretritis. La infección por *U. urealyticum* fue más frecuente en varones (87%) que en mujeres (64,7%); el riesgo de infección por *U. urealyticum* es casi un 20% más bajo en las mujeres que en los hombres (OR= 0,28; IC 95%, 0,17-0,44; p=0,00) (tabla 14). La infección por *M. hominis* fue más frecuente en mujeres (20,2%) que en varones (5,7%); el riesgo de infección por *M. hominis* es casi cuatro veces mayor en las mujeres que en los hombres (OR=4,2%; IC 95%, 2,13-8,12, p=0,00) (tabla 14). Los porcentajes de infección por *U.urealyticum* y *M. hominis* en mujeres obtenidos (64,7% y 20,2%, respectivamente) son inferiores a los hallados en Pontones (32,5% y 1,9%, respectivamente) ^[24]. Esto puede deberse a diferencias en el perfil de pacientes estudiados. Respecto a las infecciones mixtas por *U. urealyticum* y *M. hominis*, se observó un porcentaje superior de infección mixta en mujeres (15,1%) que en varones (7,3%); las mujeres presentan un riesgo 2 veces superior a los hombres de sufrir infecciones mixtas (OR=2,26; IC 95%, 1,21-4,22; p=0,01). Este estudio nos indica que el sexo se relaciona con el riesgo de sufrir infección mixta por *U. urealyticum* y *M. hominis*.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. World Health Organization. Global incidence and prevalence of curable sexually transmitted infections – 2008. Suiza;WHO;2008;p 2-16.
2. Sistema de Información Microbiológica, Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2012. Madrid;SIM; 2014; p 6-41.
3. Versalovic J, Carroll KC, Punke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of clinical microbiology. 10th edition. USA: 2011. p. 973-980.
4. Gallegos-Ávila G. Infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma* sp. su relación con la infertilidad masculina. Boletín del Colegio Mexicano de Urología, A.C.2003;(3):106-112.
5. Cevenini R, Donati M, Sambri V. *Chlamydia trachomatis* - the agent. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2002;16(6):761-773.
6. MANAVI, K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2006;20(6):941-951.
7. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Principios de medicina interna. 15ªed. España: Mcgraw-Hill,Interamericana; 2004;(ii):1101–1277.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 7ª ed. España: El sevier; 2013. p 189-390.
9. Mandell GL, Benett JE, Dulin R. Enfermedades infecciosas – principios y práctica. 6ª ed. España: El sevier; 2006. p 1347–1530.
10. Schaeffer A, Henrich B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the lymphogranuloma venereum associated I-serovars by taqman pcr. BMC Infect Dis. 2008;8(56):1-10.
11. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al. Principios de medicina interna - Enfermedades infecciosas. 17ª ed. España: Mcgraw-Hill; 2009; (i):175–235.

12. Arango A, Máttar S, Visbal JS. *Chlamydia trachomatis*: aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Revista MVZ Córdoba. 2001;6(2):87-96.
13. Alonso R, Galán JC, Fernández JG, Rodríguez-Domínguez M, Salinas, Gámez SS. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia spp* y especies relacionadas. España: SEIMC; 2012. p 1-29.
14. Taylor BD, Haggerty CL. Management of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection: screening and treatment challenges. Infect Drug Resist. 2011;(4):19-29.
15. Matejcek A, Goldman R. Treatment and prevention of *Ophthalmia neonatorum*. Can Fam Physician. 2013;(59):1187–1190.
16. Sánchez-Cano D, Porcuna NC, Sánchez MIP, García FG. Infecciones por *Mycoplasma* y *Chlamydia*. Medicine. 2006;9 (54): 3525-3531.
17. Mensa J, Gatell JM, García-Sánchez JE, Letang E, López-Suñe E, Marco F. Guía de terapéutica antimicrobiana 2014. Barcelona: Editorial Antares;2014: p 9 - 210.
18. Lanjouw E, Ossewaarde JM, Stary A, Boag F. European guideline for the management of *Chlamydia trachomatis* infections. IUSTI;2010: p 1-26.
19. Serra-Pladevall J, Barberá-Garcia MJ, Roig-Carbajosa G, Juvé-Saumell R, Gonzalez-Lopez JJ, Bartolomé-Comas R, et al. *Neisseria gonorrhoeae*: resistencias antimicrobianas y estudio de la dinámica poblacional. Situación en 2011 en Barcelona. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(9); 579-583.
20. Fanfair RN, Workowski KA. Clinical update in sexually transmitted diseases – 2014. Cleve Clin J Med. 2014;81(2); 91-101.
21. Sethi S, Golparian D, Bala M, Dorji D, Ibrahim M, Jabeen K, et al. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from India, Pakistan and Bhutan in 2007 – 2011. BMC Infect Dis. 2013;13(35); 1-8.

22. Whiley DM, Goire N, Lahra MM, Donovan B, Limnios AE, Nissen MD, et al. The ticking time bomb: escalating antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is a public health disaster in waiting. *J Antimicrob Chemother.* 2012;1-3.
23. Lewis DA, Lukehart SA. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema pallidum*: evolution, therapeutic challenges and the need to strengthen global surveillance. *Sex Transm Infect.* 2011;(87);39-43.
24. Orellana MÁ, Gómez ML, Sánchez MT, Fernández-Chacón T. Diagnóstico microbiológico de uretritis en varones. Revisión de 3 años. *Rev Esp Quimioter.* 2009;22(2);83-87.
25. Prats G. Microbiología Clínica. Buenos Aires- Madrid: Panamericana. 2005;p 17-74.
26. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic microbiology. 12ª Ed. USA: Bailey & Scott's. 2007; p 447-454.
27. Struthers JK, Westran RP. Bacteriología Clínica. Barcelona: II MASSON. 2005;p 43-149.
28. Frey MN; Ioppi AEE. *Streptococcus agalactiae* como agente etiológico de doença sexualmente transmissível. *An Bras Dermatol.* 2011;86(6);1205-1207.
29. Bayraktar MR. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis.* 2010;(14);90-95.
30. Pong MJ, Nori AV, Witney AA, Lopemam, RC, Butcher PD, Sadiq ST. High prevalence of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: the need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. *Clin Infect Dis.* 2014;58 (5); 631-636.
31. Tagg KA, Jeffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA, Gilbert GL. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol.* 2013;51(7); 2245-2248.

32. Jiménez JAL, Guerra LO, Galán MAB, Martín JA, Valdés FV. Panorama actual de la epidemiología, diagnóstico y tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;(13);25-31.
33. Bouza E, Hellín T, Pichardo AR, Ribera E. Infecciones de transmisión sexual. España; SEIMC. 2000;p 1-35.
34. Cockerill FR, Patel JB, Bradford PA, Alder J, Dudley M, Eliopoulos G, Dwight H, et al. M100-S23: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. USA; CLSI. 2013;33(1);p 96-102.
35. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014 [libro electrónico]. CLSI;2014 [Consultado: 1 Marzo de 2014]. Disponible en: <http://www.eucast.org>.
36. Piñeiro L, Montes M, Gil-Setas A, Camino X, Echeverría MJ, Cilla G. Genotipado de *Chlamydia trachomatis* en un área del norte de España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(8);462-464.
37. Yirenya-Tawiah D, Annang TN, Apea-Kubi KA, Lomo G, Mensah D, Akyeh L, et al. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* prevalence among women of reproductive age living in urogenital schistosomiasis endemic área in Ghana. *BMC Res Notes*. 2014;7(349); 1-7.
38. Corbeto EL, Lugo R, Martró E, Falguera G, Ros R, Avecilla A, et al. Prevalencia de la infección por *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae* y determinantes para su adquisición en jóvenes y adultos-jóvenes en Cataluña. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(2);96-101.
39. Fernández-Benítez C, Mejuto-López P, Otero-Guerra L, Margolles-Martins MJ, Suárez-Leiva P, Vazquez F, et al. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. *BMC Infect Dis*. 2013;13(338);1471-2334.
40. Cuffini C, Bottiglieri M, Kiguen X, Alonso CE, Deimundo RV, Isa MB, et al. Molecular Epidemiology of Genital *Chlamydia Trachomatis Infection* in

Asymptomatic Adolescent-Young People. J Microbiol Research. 2012;2(4);114-117.

41. Van Liere GAFS, Hoebe CJP, Wolffs PFG, Dukers-Muijers NHTM. High co-occurrence of anorectal chlamydia with urogenital chlamydia in women visiting an STI clinic revealed by routine universal testing in an observational study; a recommendation towards a better anorectal chlamydia control in women. BMC Infect Dis. 2014;14(274);1471-2334.

42. Silva R, León D, Viscarra T, Ili C, Roa JC, Sánchez R, et al. Frecuencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* en un grupo de mujeres de la Región de la Araucanía, Chile. Rev Chilena Infectol. 2013;30(6);611-615.

43. Verweij SP, Catsburg A, Ouburg S, Lombardi A, Heijmans R, Dutly F, et al. Lymphogranuloma venereum variant L2b- specific polymerase chain reaction: insertion used to close an epidemiological gap. Clin Microbiol Infect. 2011;17(11);1727-1730.

44. Eddleston M, Davidson R, Brent A, Wilkinson R. Oxford Handbook of Tropical Medicine. 3rd ed. Oxford University Press. 2011; p 598-610.

45. Costa LMB, Pedroso ERP, Neto VV, Souza VCP, Teixeira MJB. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending a public referral center for sexually transmitted diseases in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013;46(3);304-309.

46. Detels R, Green AM, Klausner JD, Katzenstein D, Gaydos C, Handsfield HH, et al. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. Sex Transm Dis. 2011;38(6);503-509.

47. Zimba TF, Apalata T, Sturm WA, Moodley P. Aetiology of sexually transmitted infections in Maputo, Mozambique. J Infect Dev Ctries. 2011;5(1);041-047.

48. Abdelaziz ZA, Ibrahim ME, Bilal NE, Hamid ME. Vaginal infections among pregnant women at Omdurman Maternity Hospital in Khartoum, Sudan. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(4):490-497.
49. Apalata T, Zimba TF, Sturm WA, Moodley P. Antimicrobial susceptibility profile of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients attending a STD facility in Maputo, Mozambique. *Sex Transm Dis*. 2009;36:341–343.
50. Olsen B, Ian PT, Golparian D, Johansson E, Khang TH, Unemo M. Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Vietnam, 2011. *BMC Infect Dis*. 2013;13(40):1-8.
51. Brown LB, Krysiak R, Kamanga G, Mapanje C, Kanyamula H, Banda B, et al. *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility in Lilongwe, Malawi 2007. *Sex Transm Dis*. 2010;37(3):169-172.
52. Tadesse A, Mekonnen A, Kassu A, Asmelash T. Antimicrobial sensitivity pattern of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in males of North Ethiopia. *East Afr Med J* 2001;78(5):42-44.
53. Zhang LJ, Mo JL, Wang F, Peng Y, Zhao GL, Lu DL. Molecular characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone in Shenzhen from 2009 to 2011. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2013;47(10):940-944.
54. Casco RH, García SD, Perazzi BE, De Mier C, Yay CA, Famiglietti AMR. *Neisseria gonorrhoeae*. Resistencia a los antibióticos. *Dermatol Argent*. 2011;17(5):396-401.
55. LEWIS DA. Antimicrobial-resistant gonorrhoeae in Africa: An important public health threat in need of a regional gonococcal antimicrobial surveillance programme. *South Afri J Epidemiol Infect*. 2011;26(4):215-220.
56. Ison CA, Golparian D, Saunders P, Chisholm S, Unemo M. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally. *Sex Transm Infect*. 2013;(89):197-201.

57. European Centre for Disease Prevention and Control. Technical report: Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae*. Results from a pilot study 2010 – 2011. Stockholm;EDCD;2012;p 2-25.

58. Endimiani A, Guilarte YN, Tinguely R, Hirzberger L, Selvini S, Lupo A, et al. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates detected in Switzerland (1998 – 2012): emergence of multidrug – resistant clones less susceptible to cephalosporins. BMC Infect Dis. 2014;14(106);1-10.

59. Monfort L, Caro V, Devaux Z, Delannoy AS, Brisse S, Sednaoui P. First *Neisseria gonorrhoeae* genotyping analysis in France: identification of a strain cluster with reduced susceptibility to ceftriaxone. J Clin Microbiol. 2009;47(11);3450-3545.